昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, May 2013, 56(5): 566 – 569 ISSN 0454-6296

两个单点突变对昆虫羧酸酯酶降解马拉硫磷的影响

张柳平[1,2,#], 姚淑敏[1,#], 林 哲[2], 崔 峰[2,*]

(1. 曲阜师范大学生命科学学院, 山东曲阜 273165;
2. 中国科学院动物研究所, 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100101)

摘要: 马拉硫磷是一种高效低毒的有机磷杀虫剂, 分子量大且结构特殊, 广泛用于农业害虫的防治。羧酸酯酶突变是昆虫对有机磷类杀虫剂产生代谢抗性的重要机制之一。本实验室前期已从棉蚜 *Aphis gossypii*、褐飞虱 *Nilaparvata lugens*、斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*、家蚕 *Bombyx mori*、异色瓢虫 *Harmonia axyridis*、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 和西方蜜蜂 *Apis mellifera* 中各克隆了一个非特异性羧酸酯酶基因, 通过体外定点突变构建了 G/A151D 和 W271L 两种突变体, 并进行了原核细胞表达和纯化。本实验在体外测定了这 7 种昆虫野生型和两种突变型羧酸酯酶对马拉硫磷的降解。结果显示: 棉蚜、西方蜜蜂、斜纹夜蛾、赤拟谷盗的野生型羧酸酯酶能够降解马拉硫磷, 两个突变并不能提高它们的降解活性, 而家蚕、异色瓢虫和褐飞虱的野生型羧酸酯酶不能降解马拉硫磷, G/A151D 和/或 W271L 突变能使这些酯酶获得马拉硫磷羧酸酯酶(MCE)的活性, 有可能使这些昆虫对马拉硫磷产生抗性。不同物种的 MCE 活性相差较大, 斜纹夜蛾的 MCE 活性最高, 其 k_{cat}/K_m 值为 1.8 ~ 1.9 L/μmol · min, 其次是赤拟谷盗, 其 K_{cat}/K_m 值为 0.87 ~ 0.95 L/μmol · min, 其他昆虫的 MCE 活性相对较低, 相差可高达 10 倍。

关键词: 羧酸酯酶; 抗药性; 突变; 马拉硫磷; 酶动力学

中图分类号: Q966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2013)05-0566-04

Effect of two single mutations on malathion degradation by insect carboxylesterases

ZHANG Liu-Ping[1,2,#], YAO Shu-Min[1,#], LIN Zhe[2], CUI Feng[2,*] (1. College of Life Sciences, Qufu Normal University, Qufu, Shandong 273165, China; 2. State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: Malathion is an efficient but low toxic organophosphate insecticide with a large molecular weight and a special structure. It is widely used in the prevention and control of various agricultural pests. Mutation in carboxylesterases is one of important metabolic resistance mechanisms to organophosphate insecticides in insects. In a previous study, seven non-specific carboxylesterase genes from *Aphis gossypii*, *Nilaparvata lugens*, *Spodoptera litura*, *Bombyx mori*, *Harmonia axyridis*, *Tribolium castaneum* and *Apis mellifera*, respectively, were cloned, mutated at position 151 or 271 and expressed in *Escherichia coli*. In this experiment, the hydrolysis of the purified recombinant proteins of the seven insects was further examined towards malathion. The results showed that the wild-type carboxylesterases from *A. gossypii*, *A. mellifera*, *S. litura* and *T. castaneum* were capable of degrading malathion and the two single mutations did not improve their hydrolysis activity. The wild-type carboxylesterases from *B. mori*, *H. axyridis* and *N. lugens* could not degrade malathion while the G/A151D and/or W271L mutation made these esterases acquire malathion carboxylesterase activity, implying that these two single mutations could confer resistance to malathion in the three insects. Malathion carboxylesterase activity in different species had large difference. *S. litura* had the highest malathion carboxylesterase activity, and its K_{cat}/K_m was 1.8 – 1.9 L/μmol · min, followed by *T. castaneum*, with the K_{cat}/K_m of 0.87 – 0.95 L/μmol · min. Malathion carboxylesterase activity in other insects was relatively low, with ten-fold difference.

Key words: Carboxylesterase; insecticide resistance; mutation; malathion; enzymatic dynamics

基金项目: 国家科技重大专项(2012ZX10004219)

作者简介: 张柳平, 女, 1987 年 6 月生, 山东菏泽人, 硕士研究生, 研究方向为生物资源的利用与开发, E-mail: liuping2006.cool@163.com; 姚淑敏, 女, 1967 年 11 月生, 山东临清人, 博士, 副教授, 研究方向为生物资源的利用与开发, E-mail: yaoshumin299@163.com

[#]共同第一作者 Authors with equal contribution

[*]通讯作者 Corresponding author, E-mail: cuif@ioz.ac.cn

收稿日期 Received: 2013-01-19; 接受日期 Accepted: 2013-03-21

长期以来由于杀虫剂的选择作用，导致许多昆虫对多种杀虫剂产生了不同程度的抗药性。害虫抗药性的增高，既导致了农业生产成本的增加，同时对环境及公众健康也产生较大影响。昆虫抗药性的分子机理主要包括代谢抗性和靶标抗性两方面（Hemingway *et al*., 2004）。

羧酸酯酶是昆虫抵御包括杀虫剂在内的外源化合物的重要物质之一，在常用的有机磷和氨基甲酸酯抗性中起着重要的作用，可以使昆虫产生代谢抗性。羧酸酯酶通过两种方式使昆虫对有机磷杀虫剂产生代谢抗性，一种是数量机制，即通过羧酸酯酶在基因组上扩增或转录水平的上调而过量表达酯酶，酯酶快速与杀虫剂分子结合，但是水解速度非常缓慢，所以羧酸酯酶主要起屏蔽作用。这种机制在昆虫中十分普遍，如尖音库蚊复组 *Culex pipiens* complex、三带喙库蚊 *Culex tritaeniorhynchus*、环跗库蚊 *Culex tarsalis*、桃蚜 *Myzus persicae* 和麦二叉蚜 *Schizaphis graminum*。另一种是质量机制，即羧酸酯酶的表达水平不变，但酶的性质发生了变化，羧酸酯酶原有的活性降低或丧失，而水解有机磷杀虫剂的速率大大提高。羧酸酯酶性质的改变是因为分别在两个位置发生了点突变，即 G151D 突变和 W271L 突变。目前质量机制仅在几个高等双翅目昆虫的抗性种群中发现，如铜绿蝇 *Lucilia cuprina*、丝光绿蝇 *Lucilia sericata*、螺旋蝇 *Cochliomyia hominivorax* 和家蝇 *Musca domestica*。体外实验证明黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的羧酸酯酶 αE7 和尖音库蚊 *C. pipiens* 的羧酸酯酶 B1 突变后酶的性质也发生了类似的变化（Cui *et al*., 2007, 2011）。

本实验室通过从棉蚜 *Aphis gossypii*、褐飞虱 *Nilaparvata lugens*、斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*、家蚕 *Bombyx mori*、异色瓢虫 *Harmonia axyridis*、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 和西方蜜蜂 *Apis mellifera* 中各克隆了一个非特异性羧酸酯酶基因，利用体外定点突变技术在第 151 和 271 位点进行点突变，获得 G/A151D 和 W271L 两种突变体。发现 G/A151D 或/和 W271L 突变能够使大部分羧酸酯酶大大提高降解对氧磷和毒虫畏的效率。这些体外实验证明 G/A151D 或 W271L 突变带来的质量抗性机制在昆虫中可能也具有普遍性（Cui *et al*., 2011）。

马拉硫磷是一种高效低毒的有机磷杀虫剂，被广泛用于农业防害以及粮食仓储。与其他有机磷杀虫剂相比，马拉硫磷的分子量很大（330.35），且同时具有硫代磷酰键和羧酸酯键（巨修练和李常平，2010；赵静等，2011）。能够水解马拉硫磷的羧酸酯键的酯酶特称为马拉硫磷羧酸酯酶（MCE）。G/A151D 或 W271L 突变能否改变昆虫羧酸酯酶对马拉硫磷的降解活性呢？本研究通过气相色谱法测定了上述 7 种昆虫的野生型和两个突变体羧酸酯酶对马拉硫磷的降解活性，对该问题的回答可以预测这两个突变是否能使昆虫对马拉硫磷产生抗性。

1　材料与方法

1.1　主要仪器与试剂

上海精宏实验设备有限公司 DK-8D 型电热恒温水槽；美国惠普 5890II 型气相色谱仪；正己烷、无水硫酸钠均为北京化工厂分析纯；95% 原油马拉硫磷，青岛农药厂生产；RNA 提取试剂盒，RNeasy Mini Kit，Qiagen，USA；反转录试剂盒，SuperScript™ III，Invitrogen，USA；突变试剂盒，QuikChange™ Kit，Stratagene，USA。

1.2　基因克隆、突变、表达及纯化

用试剂盒提取棉蚜、褐飞虱、斜纹夜蛾、家蚕、异色瓢虫、赤拟谷盗和西方蜜蜂的总 RNA，反转录成 cDNA。根据 GenBank 的基因信息，设计引物从各 cDNA 文库中克隆羧酸酯酶的开放阅读框。通过与羊绿蝇的羧酸酯酶 E3 序列比对，找到与其突变位点 151 和 271 相对应的氨基酸，进行位点特异性的核苷酸单点突变，分别得到 G/A151D 和 W271L 两种突变体。将各野生型和突变型羧酸酯酶与 pET28a 载体相连，构建带有 His-tag 标签的融合表达载体，在大肠杆菌 BL21（DE3）细胞表达，用 His-tag 柱亲和层析纯化蛋白（Cui *et al*., 2011）。

1.3　利用气相色谱测定羧酸酯酶对马拉硫磷的降解

用气相色谱法测定各种昆虫野生型及突变型羧酸酯酶对马拉硫磷的降解。用磷酸盐缓冲液（pH 7.0）配制 0.2 ~ 12.8 mg/L 一系列浓度梯度的马拉硫磷，加入 0.2 mg 纯酶，总反应体系为 15 mL，反应温度为 37℃，以不加酶的溶液作为对照。反应 45 min 后取 0.5 mL 反应液，用 0.5 mL 正己烷提取 3 次，提取液用无水硫酸钠干燥后，再用正己烷抽提，定容 2 mL，抽提液用惠普 5890II 型气相色谱仪分析，氮磷检测器（NPD），毛细柱 SGE 公司产品，柱长 30 m，内径 0.53 mm，膜厚 0.5 μm，检测器温度 300℃，进样口温度 250℃，柱温 200℃，柱流量 2.79 mL/min，线速度 29.7 cm/s，分流比 2.2∶1，空

气压力 58 psi，氢气压力 21 psi，氮气压力 52 psi，空气流量 81 mL/min，氢气流量 3 mL/min，氮气流量 30 mL/min。分别配置 2 ~ 450 μmol/L 浓度的马拉硫磷标样，根据以上色谱分析方法积分计算不同浓度下的峰面积，每个浓度重复 3 次，依据不同的农药浓度对应不同的色谱峰峰面积作农药的标准曲线图。

1.4 数据统计

根据标准曲线计算马拉硫磷的减少量，计算酯酶在不同底物浓度下的水解速度，用 HYPER 软件根据 Lineweaver-Burk 法计算米氏常数 K_m 和反应常数 K_{cat} 值，然后计算催化效率 K_{cat}/K_m 值。所有统计数值均为平均值 ± 标准误(*SE*)。

2 结果

7 种昆虫的羧酸酯酶对有机磷杀虫剂马拉硫磷的降解分为两组：一组是棉蚜、蜜蜂、斜纹夜蛾、赤拟谷盗的野生型羧酸酯酶能够降解马拉硫磷，两个突变并不能提高它们的降解活性；另一组是家蚕、异色瓢虫、褐飞虱的野生型羧酸酯酶不能降解马拉硫磷，而 G151D 和/或 W271L 突变能使这些酯酶降解马拉硫磷，获得马拉硫磷羧酸酯酶的活性，有可能使这些昆虫对马拉硫磷产生抗性。家蚕 G151D 和 W271L 突变体都具有 MCE 活性，而异色瓢虫和褐飞虱只有 W271L 突变体具有 MCE 活性。不同物种的 MCE 活性相差较大，斜纹夜蛾的 MCE 活性最高，其 K_{cat}/K_m 值为 1.8 ~ 1.9 L/μmol · min，其次是赤拟谷盗，其 K_{cat}/K_m 值为 0.87 ~ 0.95 L/μmol · min，其他昆虫的 MCE 活性相对较低，相差可高达 10 倍(表 1)。

表 1 野生型和突变型羧酸酯酶对马拉硫磷的降解活性

Table 1 The hydrolysis activities of wild-type and mutant carboxylesterases toward malathion

昆虫 Insect	酶 Enzyme	马拉硫磷 Malathion		
		K_m(μmol/L)	K_{cat}(/min)	K_{cat}/K_m(L/μmol · min)
棉蚜 *Aphis gossypii*	WT	3.70 ± 0.10	0.67 ± 0.01	0.18 ± 0.01
	A151D	4.30 ± 0.10	0.73 ± 0.02	0.17 ± 0.01
	W271L	3.40 ± 0.04	0.57 ± 0.01	0.17 ± 0.01
西方蜜蜂 *Apis mellifera*	WT	6.10 ± 0.30	1.00 ± 0.04	0.17 ± 0.02
	A151D	2.60 ± 0.20	0.40 ± 0.01	0.16 ± 0.02
	W271L	2.50 ± 0.10	0.44 ± 0.02	0.18 ± 0.02
斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*	WT	7.00 ± 0.40	12.40 ± 0.60	1.80 ± 0.20
	G151D	5.00 ± 0.10	8.90 ± 0.10	1.80 ± 0.10
	W271L	4.10 ± 0.04	7.70 ± 0.10	1.90 ± 0.04
赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*	WT	7.00 ± 0.30	6.10 ± 0.20	0.87 ± 0.10
	G151D	3.20 ± 0.05	3.00 ± 0.04	0.94 ± 0.03
	W271L	3.50 ± 0.10	3.30 ± 0.10	0.95 ± 0.06
家蚕 *Bombyx mori*	WT	n. d.	n. d.	n. d.
	G151D	1.90 ± 0.10	0.23 ± 0.01	0.12 ± 0.01
	W271L	0.94 ± 0.10	0.32 ± 0.01	0.34 ± 0.05
异色瓢虫 *Harmonia axyridis*	WT	n. d.	n. d.	n. d.
	G151D	n. d.	n. d.	n. d.
	W271L	2.30 ± 0.10	0.48 ± 0.01	0.21 ± 0.01
褐飞虱 *Nilaparvata lugens*	WT	n. d.	n. d.	n. d.
	G151D	n. d.	n. d.	n. d.
	W271L	3.50 ± 0.04	0.65 ± 0.01	0.18 ± 0.01

K_m：米氏常数 Michaelis constant；K_{cat}：反应常数 Catalytic constant；WT：野生型 Wild-type；n. d.：未检出 Not detectable.

3　讨论

在高等双翅目昆虫家蝇、羊绿蝇的野生种群中，发现两种类型的有机磷抗性，一种是二嗪农抗性型，它有广泛的有机磷交叉抗性谱，尤其抗二乙氧基有机磷杀虫剂，但不抗或低抗二甲氧基有机磷和马拉硫磷；另一种是马拉硫磷抗性型，它也有广泛的有机磷交叉抗性谱，尤其抗二甲氧基有机磷，这两种抗性都伴随着羧酸酯酶活性的改变（Campbell *et al.*，1998）。后来首先在羊绿蝇中发现并证明了与这两种抗性有关的突变，即 G137D 和 W251L（与本研究的 G151D 和 W271L 突变位点相同），G137D 突变能对二乙氧基和二甲氧基有机磷的降解分别提高 55 和 33 倍，而 W251L 突变使 MCE 的活性显著上升，而且对上述两类杀虫剂的降解分别提高 10 倍和 30 倍（Newcomb *et al.*，1997；Campbell *et al.*，1998；Heidari *et al.*，2004）。在家蝇的抗性品系中也发现了 G137D 突变（Claudianos *et al.*，1999）。对果蝇的 EST23 基因在同一位点进行体外突变，G137D 和 W251L 都对二甲氧基有机磷的降解高于二乙氧基型，W251L 也会提高 MCE 的活性（Devonshire *et al.*，2003）。本研究发现家蚕、异色瓢虫、褐飞虱的羧酸酯酶发生 W271L 突变后，MCE 活性明显提高，尖音库蚊的羧酸酯酶 B1 发生 W271L 突变后也出现类似的结果（Cui *et al.*，2007），而 G151D 突变仅使家蚕的 MCE 活性提高，说明 W271L 突变对 MCE 活性提高更有效果。

G137D（即 G151D）突变位于酶催化中心的氧离子洞，W251L（即 W271L）突变位于酶的酰基结合口袋。Newcomb 等（1997）和 Campbell 等（1998）认为 G137D 突变改变了水分子亲核攻击的方向，变得有利于攻击四面体结构的磷酸化酶而不是平面结构的酰基化酶，所以使酶丧失了羧酸酯酶的活性。Campbell 等（1998）和 Devonshire 等（2003）认为 W251L 突变使酰基口袋的空间变大，不仅可以容纳具有大体积酸侧链的底物，减小磷原子倒转时的位阻，而且有利于水解体积较大的羧酸酯底物，如马拉硫磷，尽管马拉硫磷由于有一个比一般羧酸酯大得多的酸链而使亲核攻击的方向发生改变。棉蚜、蜜蜂、斜纹夜蛾、赤拟谷盗的野生型羧酸酯酶能够降解马拉硫磷，可能这 4 种酶的酰基口袋足够大，有利于马拉硫磷的水解，而 W271L 突变对酰基口袋的增大没有明显的作用，所以不能提高它们的降解活性。家蚕、异色瓢虫、褐飞虱和尖音库蚊的羧酸酯酶只有发生 W271L 突变，才能使酶的酰基口袋增大到能够容纳马拉硫磷大体积的酸侧链。

参考文献（References）

Campbell PM, Newcomb RD, Russell RJ, Oakeshott JG, 1998. Two different amino acid substitutions in the ali-esterase, E3, confer alternative types of organophosphorus insecticide resistance in the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 28(3): 139 – 150.

Claudianos C, Russell RJ, Oakeshott JG, 1999. The same amino acid substitution in orthologous esterases confers organophosphate resistance on the house fly and a blowfly. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 29(8): 675 – 686.

Cui F, Lin Z, Wang HS, Liu SL, Chang HG, Reeck G, Qiao CL, Raymond M, Kang L, 2011. Two single mutations commonly cause qualitative change of nonspecific carboxylesterases in insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 41(1): 1 – 8.

Cui F, Qu H, Cong J, Liu XL, Qiao CL, 2007. Do mosquitoes acquire organophosphate resistance by functional changes in carboxylesterases? *FASEB J.*, 21(13): 3584 – 3591.

Devonshire AL, Heidari R, Bell KL, Campbell PM, Campbell BE, Odgers WA, Oakeshott JG, Russell RJ, 2003. Kinetic efficiency of mutant carboxylesterases implicated in organophosphate insecticide resistance. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 76(1): 1 – 13.

Heidari R, Devonshire AL, Campbell BE, Bell KL, Dorrian SJ, Oakeshott JG, Russell RJ, 2004. Hydrolysis of organophosphorus insecticides by in vitro modified carboxylesterase E3 from *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34(4): 353 – 363.

Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H, 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34(7): 653 – 665.

Ju XL, Li CP, 2010. Selectivity and safety of organophosphorus insecticide. *Pesticide Science and Administration*, 31(10): 19 – 21. [巨修练, 李常平, 2010. 有机磷杀虫剂的选择性与安全性. 农药科学与管理, 31(10): 19 – 21]

Newcomb RD, Campbell PM, Ollis DL, Cheah E, Russell RJ, Oakeshott JG, 1997. A single amino acid substitution converts a carboxylesterase to an organophosphorus hydrolase and confers insecticide resistance on a blowfly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(14): 7464 – 7468.

Zhao J, Tang XY, Hua RM, Wang DS, 2011. Advance in the application and degradation of malathion. *Anhui Agric. Sci. Bull.*, 17(11): 116 – 118. [赵静, 唐欣昀, 花日茂, 王道胜, 2011. 马拉硫磷的应用及其降解研究进展. 安徽农学通报, 17(11): 116 – 118]

（责任编辑：赵利辉）